

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450461

研究課題名(和文) 自動体外受精胚作製装置の開発

研究課題名(英文) Development of automated system of in-vitro production of bovine embryos

研究代表者

佐伯 和弘 (SAEKI, Kazuhiro)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10298937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：同一のPDMS製マイクロウェル内でウシ卵子の体外成熟受精および胚培養を行うためマイクロウェルに微小流路を設置し、1個ずつ卵子を導入、微小流路を通じて培養液のウェル内での交換が可能かを検討したが、流路に卵子がはまり込むようになった。このため、代替法としてガス調節剤とウォーターバスを用いた簡易体外受精について検討したところ、1本の試験管内に卵子を導入し、培養液をピペットで交換するだけで胚盤胞を生産できるシステムの開発に成功した。また、胚発生観察(TLC)装置で個別の胚の発生を詳細に観察した。その結果、卵割のタイミングを本TLC装置で調べることで、ウシ体外受精胚の胚盤胞への発生を予測できた。

研究成果の概要(英文)：We produced PDMS micro-wells connected with narrow canals. Bovine oocytes were introduced into the wells and medium was changed through the canals, but oocytes were trapped into the canals. Therefore, we developed simple bovine IVP systems. Bovine oocytes were introduced into test tubes filled with maturation medium. The oocytes were matured then only medium was changed by small pipets with IVF medium. The oocytes were fertilized, then medium was then changed with development medium. The IVF oocytes were cultured for 168 hours. The blastocyst rates were the same with the control method. We also examine the cleavage timing of bovine IVF oocytes with small TLC device which we originally produced. We can predict blastocyst development by examining the cleavage timing.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：PDMS製マイクロウェル ウシ体外受精 自動体外受精 微小流路 経時的胚観察装置 卵割のタイミング 胚盤胞

## 1. 研究開始当初の背景

1978年、Stephoe and Edwards (Lancet, 1978) は、初めてヒトの体外受精で産子を得た。この体外受精技術は不妊治療として普及したが、初期には卵割期胚を複数個移植していたため多胎妊娠が大きな問題となった。その後、培養技術の進展により受精卵を胚盤胞まで培養でき (Quinn et al, Fert Steril, 1995)、1胚移植でも十分な妊娠率が得られる胚盤胞移植 (Gardner and Lane, Hum Reprod Update, 1995) が急速に普及するなど、多くの技術的改善により生児獲得率は約 20% となり、現在では爆発的に普及し世界的に利用される治療技術となっている。ヒトの場合、一般にホルモン処置などで成熟卵子を経膣的に採取しているが、多胞性卵胞嚢腫の患者などでは未成熟卵子の体外成熟技術も利用されるようになってきている (Picton, Curr Opin Obstet Gynecol, 2002)。一方、ウシにおいては、Iritani et al (J Reprod Fert, 1977) が初めての体外受精を報告して以来、体内成熟卵子の体外受精による産子生産 (Brackett et al, Biol Reprod, 1982)、と場卵巣卵子の体外成熟・体外受精による産子生産 (花田ら, 78 回日畜学会大会, 1986, Critser et al, Theriogenology, 1986) が報告された。その後、体外成熟・体外受精卵を卵丘細胞 (Goto et al, J Reprod Fert, 1988) や卵管上皮細胞 (Eyestone et al, J Reprod Fert, 1989) との共培養により胚盤胞期まで発生できるようになり、これら胚の非外科的移植による産子作出が可能となった。さらに、Pinyopummintr and Bavister (Biol Reprod, 1991) は、培養液のみでウシ 1 細胞期胚を胚盤胞期へ発生できることを報告した。その後、発生率向上に関する研究が進展し、現在、ウシ体外受精技術は実用化され商業利用されるようになった。このようにヒトの生殖補助医療やウシの商業的な胚移植事業などで体外受精技術が普及し広く利用されるようになった。しかし、卵子の体外成熟、体外受精さらに胚培養では、それぞれ、培養液や気相などの培養環境が異なっており、それぞれのステップで卵子や胚を培養ディッシュに作製したミネラルオイルで覆った培養液滴に卵子や胚をピペットなどで移し替える必要があり、非常に煩雑であるため卵子や胚の取り違いや紛失のリスクがある。このため、すべてのステップを同一の容器で実施し、培養液などの交換作業を自動で行うことができれば、これら手作業により多大な人的負担やリスクを大幅に低減できると考えた。

## 2. 研究の目的

一つの装置内で卵子の体外成熟、受精、胚培養を実施できる「自動体外受精胚作製装置」の開発を目指す。近年の発生工学の進展はめざましく、体外受精技術はヒトの不妊治療やウシの商業的胚生産、さらには繁殖障害治療に利用されている。しかし、近年多くの工業製品が自動化され特別な技術なしに複雑な機器を容易に操作できるようになったが、ヒトやウシの体外受精では卵子や精子の操作をすべて手作業で行っている。このことから体外受精の実施には特別

な技量を持った技術者を必要とし、実施費用も高額となり、生殖補助医療領域や獣医臨床繁殖領域での普及の阻害要因となっている。今回申請する「自動体外受精胚作製装置」が開発できれば、装置への卵子と精子および培養液を投入するだけで、一定期間後胚盤胞が作製できることとなり、人的操作を大幅に削減でき、体外受精技術のさらなる普及につながると考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 卵子を操作することなく体外成熟・受精・培養が可能な PDMS 製マイクロウェルの開発  
実験 1. 同一のマイクロウェル内でウシ胚盤胞の作製

直径 1.0mm × 深さ 1.5mm の貫通孔を開けた無孔製 PDMS プレートを用いてウシ卵子の体外成熟受精 (IVM/F) および胚培養 (IVC) が可能かどうかを検討した。ウシ卵巣から卵子 (COCs) を吸引し、MW に 1 個ずつ導入し 22 時間 IVM した。6 時間後ピペットにて IVC 培地に交換し、39、5%CO<sub>2</sub>、95%空気下で 8 日間卵丘細胞と共培養した。対照区は常法に従った。

実験 2. 微小流路を設置したマイクロウェルでの培養液交換の可能性の検討

PDMS 製のマイクロウェルに微小流路を設置し、マイクロウェルに 1 個ずつ卵子を導入、微小流路を通じて培養液のウェル内での交換が可能かを検討した。300 μm 径のマイクロウェルを縦 4 列、横 3 列に配置し、流路を横からつなぐ形態とした。マイクロウェルと流路は PDMS で作製し、上部をカバーガラスで塞いだ。卵子の導入が可能となるよう、ウェルの上方のカバーガラスを丸く開けた。今回は、シリジポンプを用い培養液を流した。

(2) ウォーターバスを用いた簡易体外受精システムの開発

実験 1. ウォーターバスと細菌培養用ガス濃度調節剤によるガスインキュベーターの代替

39 ウォーターバスと細菌培養用ガス濃度調節剤を用いて、と体由来のウシ未成熟卵子からウシ胚盤胞を生産できるかを検討した。

実験 2. 卵子を操作せずに試験管内で胚盤胞を生産するシステムの開発

ウォーターバス内で試験管に卵子を導入し培地のみを交換し、卵子を試験管外で操作せずに胚盤胞が得られるかどうか検討した。

(3) 自作の胚発生観察 (TLC) 装置を用いたウシ体外受精胚の発生観察

パイロットモデル、試作 1、2 号機をへてより小型で良好な画像取得が可能な改良版を作成したので、独自に開発した PDMS 製マイクロウェルを組み合わせ、個別の胚の発生を詳細に観察した。

## 4. 研究成果

(1) 卵子を操作することなく体外成熟・受精・培養が可能な PDMS 製マイクロウェルの開発

実験 1. 同一のマイクロウェル内でウシ胚盤胞の

## 作製

MW 区での成熟および正常受精率は、対照区と同様だった ( $P>0.05$ ) が、胚盤胞への発生率は、MW 区で 19% と対照区 (45%) よりも低率だった ( $P<0.05$ ) が、同一容器内での IVM/F/C により胚盤胞へ発生可能なことが示された。

## 実験 2. 微小流路を設置したマイクロウェルでの培養液交換の可能性の検討

図 1 及び 2 に示すように、300  $\mu\text{m}$  径のマイクロウェルを縦 4 列、横 3 列に配置し、流路を横からつなく形態とした。マイクロウェルと流路は PDMS で作製し、上部をカバーガラスで塞いだ。卵子の導入が可能となるよう、ウェルの上方のカバーガラスを丸く開けた。今回は、シリンジポンプを用い培養液を流した。培養液のプライミング後、ウシ卵子を導入したところ、すべてのウェルに卵子を静置することに成功した。静かに培養液を流したところ、流速が早いと培養液が流れ込む最初のウェルの卵子がウェル上方に押し出されることが分かった。流速を低くするといずれのウェルの卵子もウェル内に留まるものの、流路がやや太いため流れ込む流路に卵子がはまり込むようになった。図 3 に示す水頭圧差による培地交換システムは、流速が早く、速度制御が課題となった。

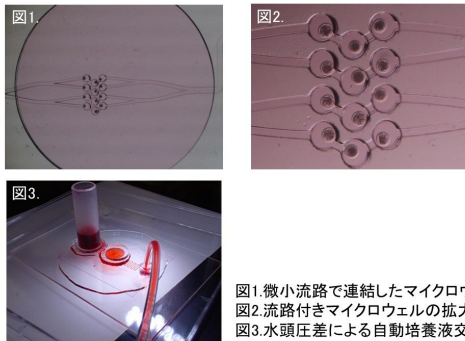


図 1. 微小流路で連結したマイクロウェル  
図 2. 流路付きマイクロウェルの拡大図  
図 3. 水頭圧差による自動培養液交換

## (2) ウォーターバスを用いた簡易体外受精システムの開発

温度制御にウォーターバスを用いてウシ卵子の体外成熟・受精で 100% 空気、胚培養のみでアネロパック微好気ガス制御したところ、 $\text{CO}_2/\text{O}_2$  インキュベーターと同等の胚盤胞発生率だった ( $P>0.05$ 、表 1)。

表 1. 恒温水槽のみ用いてガス制御せずに体外成熟・体外受精したウシ体外受精胚のアネロパックを用いた体外培養後の初期発生<sup>1</sup>

| ガス制御   |   | 温度制御     | 培養胚数 | 卵割胚数 (%) <sup>2</sup> | 胚盤胞数 (%) <sup>3</sup> |
|--|---|----------|------|-----------------------|-----------------------|
| 体外成熟・体外受精  | 体外培養  | 体外生産     |      |                       |                       |
| $\text{CO}_2$ インキュベーター (5% $\text{CO}_2$ , 95% 空気) | $\text{CO}_2/\text{O}_2$ インキュベーター (5% $\text{CO}_2$ , 5% $\text{CO}_2$ , 90% $\text{N}_2$ ) | インキュベーター | 90   | 66 (73)               | 26 (39)               |
| ガス制御なし (100% 空気)                                   | アネロパック $\text{CO}_2$ (約 5% $\text{CO}_2$ , 約 15% $\text{O}_2$ )                             | インキュベーター | 90   | 71 (79)               | 27 (38)               |
| ガス制御なし (100% 空気)                                   | アネロパック微好気 (5-8% $\text{CO}_2$ , 6-12% $\text{O}_2$ )  | 恒温水槽     | 90   | 69 (78)               | 13 (19)               |
| ガス制御なし (100% 空気)                                   | アネロパック微好気 (5-8% $\text{CO}_2$ , 6-12% $\text{O}_2$ )  | 恒温水槽     | 90   | 76 (84)               | 18 (26)               |

1. 反復実験を 3 回行った。ANOVA Tukey-Kramer により検定。  
2. (%)=卵割胚数/培養胚数。  
3. (%)=胚盤胞数/卵割胚数。

## 実験 2. 卵子を操作せずに試験管内で胚盤胞を生産するシステムの開発

実験 1 で得られた、アネロパックとウォーターバスという簡易なガスおよび温度制御方法を利用して、試験管内から一度も卵子を取り出さず、培地交換だけで体外成熟・受精・培養した。その結果、成熟率、受精率、卵割率および胚盤胞への発生率は、常法の対照区と同等 ( $P>0.05$ ) だった (表 2)。

表 2. ラウンドチューブとアネロパック微好気およびウォーターバスを用いて体外培養したウシ胚の発生<sup>1</sup>

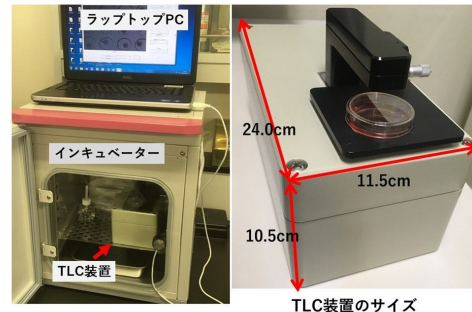
| 培養環境                     |   | 供試卵数 | 卵割胚数 (%) <sup>2</sup> | 胚盤胞数 (%) <sup>3</sup> |
|--------------------------|---|------|-----------------------|-----------------------|
| IVM-IVF                  | IVC   |      |                       |                       |
| ドロップ インキュベーター 100% 空気    | ドロップ $\text{CO}_2/\text{O}_2$ インキュベーター (5% $\text{CO}_2$ , 5% $\text{O}_2$ , 90% $\text{N}_2$ ) | 75   | 59 (79)               | 31 (53)               |
| ラウンドチューブ ウォーターバス 100% 空気 | ラウンドチューブ アネロパック・微好気 ウォーターバス (5-8% $\text{CO}_2$ , 6-12% $\text{O}_2$ )                          | 70   | 49 (70)               | 24 (49)               |

1. 反復実験を 3 回実施した。2. (卵割胚数/供試卵数)  $\times 100$  3. (胚盤胞数/卵割胚数)  $\times 100$   
ANOVA Tukey-Kramer により検定

## (3) 自作の胚発生観察 (TLC) 装置を用いたウシ体外受精胚の発生観察

自作の TLC 装置について、図 4 に示した。小型で最小のインキュベーター内に設置できるように開発した。画像は任意の時間に取得できるようにインキュベーター外に設置した PC で制御できるようになっている。

図 4. 胚発生観察 (TLC) 装置装置



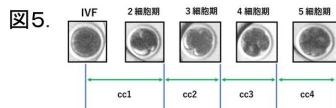
TLC 装置のサイズ

この TLC 装置を用いてウシ体外受精胚の発生を観察した。胚の卵割率と胚盤胞への発生率は、TLC 装置で、それぞれ、 $89 \pm 5\%$  と  $47 \pm 9\%$  で、対照区 ( $83 \pm 5\%$  と  $47 \pm 12\%$ ) と同等 ( $P>0.05$ ) だった。TLC 装置では、胚の卵割、桑実胚および胚盤胞への発生を示す明瞭な画像を取得することができた (表 3 および図 5)。取得した画像より、胚盤胞の発生を卵割のタイミングで予測することができた。また、ウシ胚の収縮や拡張なども明確に観察できるため、胚盤胞の誤判別を回避できた。

表3. 卵割に要する時間が胚の発生に及ぼす影響

| 胚分類     | 卵割時間(h) <sup>2)</sup>    |         |         |                       |
|---------|--------------------------|---------|---------|-----------------------|
|         | cc1                      | cc2     | cc3     | cc4                   |
| 拡張胚盤胞以上 | 27.6±2.4 <sup>a)</sup>   | 7.1±4.4 | 2.1±3.8 | 7.6±1.4 <sup>a)</sup> |
| 初期胚盤胞   | 29.8±2.7 <sup>b,c)</sup> | 8.8±4.0 | 2.3±3.7 | 7.0±3.7               |
| 非発生胚    | 29.9±5.0 <sup>b,c)</sup> | 5.9±4.9 | 4.4±4.8 | 4.7±3.8 <sup>b)</sup> |

1) 胚発生率を比較した。統計処理 ANOVA Tukey-Kramer(法を用い、a,b,cは異なる有意差を示す) p<0.05  
2) 卵割時間(平均値±標準偏差)を示した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) Iwamoto D, Yamagata K, Kishi M, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Wakayama T, Saeki K. Early development of cloned bovine embryos produced from oocytes enucleated by fluorescence metaphase II imaging using a conventional halogen-lamp microscope. Cell Reprogram, 査読有り、17, 106-114, 2015.  
DOI: 10.1089/cell.2014.0086

〔学会発表〕(計15件)

- (1) 中西阜介、加藤暢宏、吉浦克彦、帆風直人、朴忠植、山東悠介、佐伯和弘。開発したタイムラプスモニタリング装置とPDMS製マイクロウェルを組み合わせたウシ胚の個別培養における卵割と胚盤胞発育の観察。平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会。金沢市アートホール(石川県金沢市)2017年02月24日~2017年02月26日
- (2) 帆風直人、中西阜介、佐伯和弘。試験管内から卵子を取り出すことなくウシの胚盤胞を作成できる簡易な胚体外生産方法の開発。平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会。金沢市アートホール(石川県金沢市)2017年02月24日~2017年02月26日
- (3) Saeki K, Fujiki Y, Miyata Y, Park C, Sando Y, Kato N. Monitoring development of bovine early embryos with a home-made time-lapse cinematography device. 18th International Congress of Animal Reproduction. Tours (France) 2016年06月26日~2016年06月30日
- (4) 藤木雄太、佐伯和弘。ガス濃度調節剤と恒温水槽を用いた簡易なウシ胚の体外生産法の検討。平成27年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会。にぎわい交流館AU(秋田県秋田市)2016年02月26日~2016年02月28日
- (5) Miyata S, Park C, Sando Y, Fujiki Y, Saeki K, Kato N. Development of Embryo Monitoring System using Time-Lapse Cinematography. 生体医工学シンポジウム2015,岡山国際交流センター(岡山県岡山市)2015年09月25日~2015年09月26日
- (6) Saeki K, Fujiki Y. In-vitro Maturation of Bovine Oocytes without Gas Phase Control: Effects of Media on their subsequent Development. Istanbul (Turkey) 2015年09月13日~2015年09月17日
- (7) Fujiki Y, Saeki K. Quality of bovine embryos produced using chemical packets that regulate CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. 32nd world Veterinary Congress. Istanbul (Turkey) 2015年09月13日~2015年09月17日
- (8) 藤木雄太、佐伯和弘。ガス制御をしないウシ卵の体外成熟における培地とその後の発生への影響。日本畜産学会第120回大会。酪農学園大学(北海道江別市)2015年09月11日~2015年09月12日
- (9) 藤木雄太、佐伯和弘。ガス濃度調節剤を用いたウシ卵の体外成熟、受精および胚培養。第22回日本胚移植研究会大会。高知大学農学部(高知県南国市)2015年08月27日~2015年08月28日
- (10) Saeki K, Fujiki Y, Tamada H. A simple method for in-vitro production of bovine embryos using chemical packets that regulate CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> and a temperature-adjustable water bath. 48th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, San Juan, Puerto Rico (USA) 2015年06月18日~2015年06月22日
- (11) 宮田静、朴忠植、山東悠介、藤木雄太、佐伯和弘、加藤暢宏。胚観察のためのTLC装置の開発。第54回日本生体医工学会大会。名古屋国際会議(愛知県名古屋市)2015年05月07日~2015年05月09日
- (12) 藤木雄太、佐伯和弘。ガス濃度調節剤と恒温水槽を用いた簡易なウシ胚の体外生産法の検討。日本畜産学会第119回大会。宇都宮大学(栃木県宇都宮市)2015年03月27日~2015年03月30日
- (13) Saeki K, Fujiki Y. In vitro production of bovine embryos using chemical packets that regulate CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. 41st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Versailles (France) 2015年01月10日~2015年01月13日
- (14) 藤木雄太、佐伯和弘。ガス濃度調節剤を用いたウシ卵の体外成熟、受精および胚培養。第21回日本胚移植研究会大会。岡山大学(岡山県岡山市)2014年09月11日~2014年09月12日

- (15) 藤木 雄太、佐伯 和弘. 微好気性菌培養用ガス濃度調節剤を用いたウシ体外受精胚の体外培養. 第107回日本繁殖生物学会大会. 帯広畜産大学(北海道帯広市)2014年08月20日~2014年08月24日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐伯 和弘 (SAEKI, Kazuhiro)  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号: 10298937

### (2) 研究分担者

加藤 暢宏 (KATO, Nobuhiro)  
近畿大学・生物理工学部・准教授  
研究者番号: 60309268

### (3) 連携研究者

橋本 周 (HASHIMOTO, Shu)  
大阪市立大学医学(系)研究科(研究院)  
研究者番号: 30570949